Aus der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik
Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. K.-H. Vosteen)

Untersuchungen über die Wirkung von Etacrynsäure und Ouabain auf den Endolymphraum des Froschohres

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Burkhard Schaube
1980

1981

Aus der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik
Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. K.-H. Vosteen)

Untersuchungen über die Wirkung von Etacrynsäure und Ouabain auf den Endolymphraum des Froschohres

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Burkhard Schaube
1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit der Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. M. Straßburg

Referent
gez.: Prof. Dr. C. Morgenstern

Korreferent
gez.: Prof. Dr. G. Arnold

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0079

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG 1

II. METHODE

1) Anatomie des Froschohres 3
2) Narkose und Präparation 7
3) Elektroden 8
4) Versuchsaufbau 9
5) Applikationsarten 9
6) Histologische Präparate 13

III. ERGEBNISSE

A) Potentialmessungen
1) Endolymphatisches Potential beim Frosch 14
2) Intraperitoneale Applikation
a) Etacrynsäure 16
b) Ouabain 16
3) Intraendolymphatische Applikation
a) Etacrynsäure 17
b) Ouabain 19
4) Intraperilymphatische Applikation
a) Etacrynsäure 2o
b) Ouabain 22

B) Histologische Untersuchungen 24

IV. DISKUSSION 27

V. ZUSAMMENFASSUNG 41

Literaturnachweis 42

I. EINLEITUNG

Die zuerst am Innenohr von Säugetieren beobachteten Cochlearpotentiale konnten auch bei Vögeln und Kaltblütern nachgewiesen werden. Das endolymphatische Potential (EP) kann nach seiner Größe und Reaktion auf Anoxie wie folgt unterschieden werden (Schmidt u. Fernandez, 1962, Schmidt, 1963):

Kaltblüter	endolymphatisches Potential	<13 mV	Anoxie insensitiv
Vögel	endochochleäres Potential	<20 mV	Anoxie sensitiv
Säugetiere	endochochleäres Potential	60-100 mV	Anoxie sensitiv
	endolymphatisches Potential in Utrikel, Sacculus und Bogengängen	0-5 mV	Anoxie sensitiv

Ausgangspunkt für die Entstehung des EP ist die Differenzierung des endolymphatischen Endothels vom gefäßlosen Endothel der Amphibien über das Tegmentum vasculosum der Vögel zur Stria vascularis der Warmblüter.

In der klinischen Anwendung von Etacrynsäure sind wiederholt reversible und irreversible Schwerhörigkeit und Taubheit beschrieben worden (Maher und Schreiner, 1965; Schneider und Becker, 1966; Morrison et al., 1971; Barjon et al., 1972; Carmody et al., 1973; Matz, 1976). Experimentell zeigten sich dosisabhängige Veränderungen der Cochlearpotentiale und der endolymphatischen Ionenkonzentrationen (Silverstein u. Yules, 1971; Prazma et al., 1972; Bosher, 1973 u. 1977; Kusakari et al., 1978). Da am Warmblüter ein Abfall des positiven EP von + 80/90 mV auf - 40 mV nach Injektion von 60 mg/kg Etacrynsäure festgestellt wurde (Sellick u. Johnstone, 1975; Bosher et al., 1973; Morgenstern et al., 1977) war die Frage zu prüfen, ob mit einem Vergleich der Wirkung der gleichen Substanz bei verschiedenen Tierarten Aufschlüsse über die Bildung des EP erhalten werden können; außerdem sollte festgestellt werden, ob die spezifische Zusammensetzung der Endolymphe - die sich in keinem anderen Organ in einer derart hohen Kaliumkonzentration extrazellulär findet - durch Etacrynsäure in ihrer Zusammensetzung beeinflußt wird. So sollte etwas

Näheres darüber erfahren werden, wie in der Phylogenese die Stria vascularis ihre Funktion entwickelt.

Über die Wirkung von Etacrynsäure am Gleichgewichtsorgan liegen bisher widersprüchliche Ergebnisse vor. Es sind nur wenige klinische Fälle mit Schwindelerscheinungen bei Überdosierung von Etacrynsäure beschrieben worden (Maher u. Schreiner, 1965; Pillay et al., 1969). Levinson et al. (1974) und Mathog (1977) beobachteten an der Katze bei thermischer Prüfung des Nystagmus eine sofortige und kurzfristige Reduktion des Vestibulo-oculären Reflexes. Kusakari et al. (1979) sahen eine Verringerung des rotatorisch ausgelösten Nystagmus und einen Abfall des EP in der Ampulle (Kusakari u. Thalmann, 1976). Im Gegensatz dazu konnten Sellick u. Johnstone (1975) bei i.v. Injektion von Etacrynsäure keine Wirkung auf das EP um Utrikel feststellen; fügten sie aber Etacrynsäure der Perilymphe zu, war im Utrikel ein Abfall des EP von etwa 0 mV auf -40 mV nachweisbar. Nach Hypoxie stieg dieses negative Potential auf -20 mV an. Perilymphatisch appliziertes Ouabain führte ebenfalls zu einem EP von ungefähr -20 mV.

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten morphologische Veränderungen am Innenohr nach Etacrynsäuregabe nachweisen. Schon wenige Minuten nach Injektion ergaben sich Blasenbildungen in den Marginalzellen der Stria vascularis, danach entwickelten sich inter- und intrazelluläre Ödeme in der Intermediärzellschicht.Auch wurden degenerative Veränderungen an den äußeren Haarzellen beschrieben (Silverstein u. Yules, 1971; Bosher et al.,1973; Annikø, 1978). Ebenso wie der EP-Abfall sind auch diese Veränderungen dosisabhängig und reversibel, wobei die Rückbildung der morphologischen Veränderungen wesentlich langsamer verläuft als die Normalisierung des EP und der Elektrolytveränderungen (Bosher, 1977; Brummet et al., 1977; Morgenstern et al., 1977). Nakai (1971) und Matz (1976) konnten auch an den Haarzellen des Gleichgewichtsorgans zystische Degenerationen beobachten.

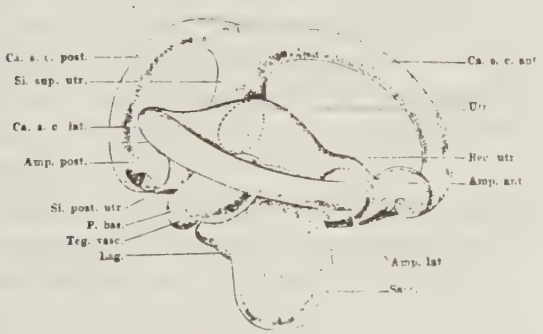
II. METHODE

1) Anatomie des Froschohres

Das Froschohr läßt sich anatomisch in Ohrkapsel mit dem Labyrinthorgan und in Mittelohr unterteilen. Ein äußeres Ohr gibt es nicht, da das Trommelfell am Ende der Paukenhöhle direkt unter der Außenhaut gelegen ist.

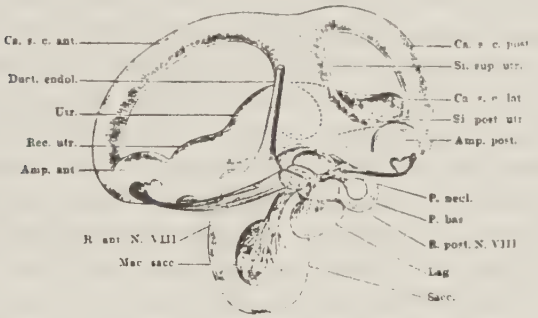
Den vorderen Teil der Ohrkapsel bildet das Prooticum, den hinteren das Os occipitale laterale; getrennt werden beide Knochen durch ein gürtelförmig angeordnetes Knorpelband, der Cartilago prooticooccipitalis. Überlagert wird die Ohrkapsel streckenweise vom Os Frontoparietale, vom Tympanicum und Parasphenoid.

Der obere Teil des häutigen Labyrinthes wird durch den Utrikel, dem die drei Bogengänge mit ihren Erweiterungen, den Ampullen ansitzen, gebildet; der untere Teil besteht aus dem Sacculus mit seinen nischenförmigen Nebenräumen: Papilla basilaris, Papilla amphiborum (Pars neglecta), der Lagena, dem entwicklungsgeschichtlichen Vorläufer der Cochlea und dem Tegmentum vasculosum-Äquivalent (siehe Abbildung 1 u. 2).



Abd. 1 Häutiges Labyrinth von Rana esculenta, von außen (Ecker et al. 1904)

Ein schlitzförmiger Spalt, das Foramen utriculo-sacculare verbindet Utrikel und Sacculus; an dieser Stelle sind der obere und untere Teil des häutigen Labyrinthes streckenweise miteinander verwachsen. Von der oberen medialen Sacculusabteilung geht der Ductus endolymphaticus in die Schädelhöhle und erweitert sich dort zum Saccus endolymphaticus.



Abd. 2 Häutiges Labyrinth von Rana esculanta, von innen (Eckert et al., 1904)

Durch das Foramen acusticus anterior und posterior verlaufen die beiden Äste des VIII. Hirnnerven zu den acht Nervenendstellen am Labyrinthorgan. Es sind dies:

1) Die drei Cristae ampullares der Bogengänge, sie reagieren auf Drehbeschleunigung.

2) Die drei Maculae, Rezeptoren der Linearbeschleunigung. Sie sind auf dem ventralen Boden des Utrikels, der medialen Sacculuswand und in der Lágena gelegen.

3) Die beiden akustischen Rezeptoren: Papilla amphiborum für niedrige Frequenzen und Papilla basilaris für hohe Frequenzen.

Sowohl die Cristae ampullares des Statolithenapparates als auch die Maculae des Otolithenapparates haben eine besondere Anordnung im Raum. Die Rezeptoren dieser beiden Gruppen stehen jeweils senkrecht zueinander.

Das häutige Labyrinth ist von perilymphatischem Gewebe und Perilymphraum umgeben. Besonders die Bogengänge und die mediale Wand von Utrikel und Sacculus werden durch dieses perilymphatische Gewebe am Periost der Ohrkapsel befestigt. Von der oberen Sacculusabteilung erstreckt sich nach lateral und nach unten bis zur Fenestra vestibuli das große Spatium sacculare. Der Ductus perilymphaticus stellt von dort die Verbindung zum Saccus perilymphaticus her. Dieser Perilymphraum dehnt sich in der hinteren Ohrkapsel medial der Papilla basilaris zwischen Spatium meningeale und rundem Fenster (Foramen jugulare) aus.

Im Mittelohr werden die Schallwellen vom Trommelfell über Plectrum und Operculum an der Fenestra vestibuli der Ohrkapsel auf die Perilymphe übertragen; von dort pflanzen sich die Schallwellen über die Endolymphe zu den akustischen Rezeptoren fort (Wever, 1973).

Auf der Ventralfläche der Ohrkapsel entspringen nach vorne der M. retractor bulbi und nach hinten der M. levator scapulae inferior.

Die A.carotis interna verläuft ventral des M. levator scapulae inferior über den Querarm des Parasphenoids zum lateralen Rand des M. retractor bulbi. Nach Abgabe der A. palatina wendet sich die A. carotis interna dorsalwärts und teilt sich dann in ihre Endäste A. ophtalmica und A. carotis cerebralis auf. Aus dem hinteren Ast der letztgenannten Arterie geht die A. auditiva ab und dringt mit dem Ramus anterior des VIII. Hirnnerven in die Ohrkapsel ein.

2) Narkose und Präparation

Die Versuche wurden an Rana esculenta (grüner Wasserfrosch) zu allen Jahreszeiten durchgeführt. Die Tiere hatten ein Gewicht von 25 - 60 g und wurden mit 0,3 - 0,8 ml einer 25 % Urethanlösung intraperitoneal narkotisiert. Bei Bedarf wurden im Laufe des Versuchs noch zusätzlich 0,1 - 0,3 ml Urethanlösung injiziert.

Die Präparation des Sacculus erfolgte von der Ventralseite. Die Versuchstiere wurden mit geöffnetem Maul auf den Rücken gelegt und fixiert. Mit einem Schleimhautschnitt über Längs- und Querarm des Parasphenoids zur Tuba auditiva wurde der Boden der Ohrkapsel freigelegt. Der Musculus retractor bulbi und der Muscuculus levator scapulae inferior wurden von der Ohrkapsel abgetrennt, dann wurde das runde Fenster mit der Membrana tympani secundaria freipräpariert. Die Arteria carotis interna wurde entweder nach medial oder lateral verlagert und vorsichtig fixiert. Durch Abtragen des Deckknochens (Parasphenoid) und der rachenwärts gelegenen Wand der Ohrkapsel (Cartilago prootico occipitalis) bis zum Operculum wurde jetzt der Perilymphraum (Cavum sacculare) freigelegt (siehe Abbildung 3). Der Blick in den Sacculus wird durch den großen Otolithen der ventro-medial gelegenen Macula sacculi behindert.

3) Elektroden

Die Elektroden wurden aus mit einem feinem Filament durchzogenen Kapillaren aus Pyrexglas hergestellt. Die auf 10 cm Länge zugeschnittenen Kapillaren wurden zuerst wie folgt gereinigt:

- 15 Min. in einem Ultraschallwasserbad
- mehrmaliges Durchspülen mit Methanol
- 2 Std. trocknen bei 200° C.

Die gereinigten Kapillaren wurden anschließend auf eine Spitzenlänge von 10 - 15 mm Länge gezogen und unter dem Mikroskop wurden nur Kapillaren mit einem Spitzendurchmesser $\leq 1\,\mu m$ zur weiteren Verwendung aussortiert. Nach Füllung mit einer 2,7 M KCl-Lösung wurden die Elektroden vor Versuchsbeginn noch mikroskopisch auf Luftblasen und Beschädigungen an der Spitze kontrolliert.

Der Gleichstromwiderstand der Elektroden betrug 10 - 30 M Ohm.

Die Elektroden hatten einen Drift von 0 - 1 mV nach 5 Stunden und von 2 - 3 mV nach 10 Stunden.

Das Spitzenpotential der Elektroden betrug -1 bis -6mV.

4) Versuchsaufbau

Die im folgenden beschriebene Messapparatur wurde in einem Faraday'schen Käfig untergebracht. Das Versuchstier, sowie alle Gerätschaften wurden geerdet. Als Messinstrument diente ein hochohmiges Voltmeter (Differential-Elektrometer der Firma Keithly, Modell 604). Sein Ein-/Ausgangskabel wurde am Elektrodenhalter mit zwei chlorierten Silberdrähten verlötet. Der eine Silberdraht wurde als Referenzelektrode durch einen Hautschnitt in die Pectoralismuskulatur geschoben, der andere in die Glaselektrode gesteckt. Die Aufzeichnung der Messung erfolgte durch einen Kompensationsschreiber der Firma Rikadenki.

5) Applikationsarten von Etacrynsäure und Ouabain

Natriumetacrynat (Hydromedin^{R}, Merck, Sharp u. Dohme) und Ouabain (G-Strophantin, kristall., reinst, Merck Art. 7897) wurden zur Herstellung der jeweiligen Injektionslösungen in den unter "Ergebnisse" angegebenen Konzentrationen in den entsprechenden Lösungsmitteln aufgelöst.

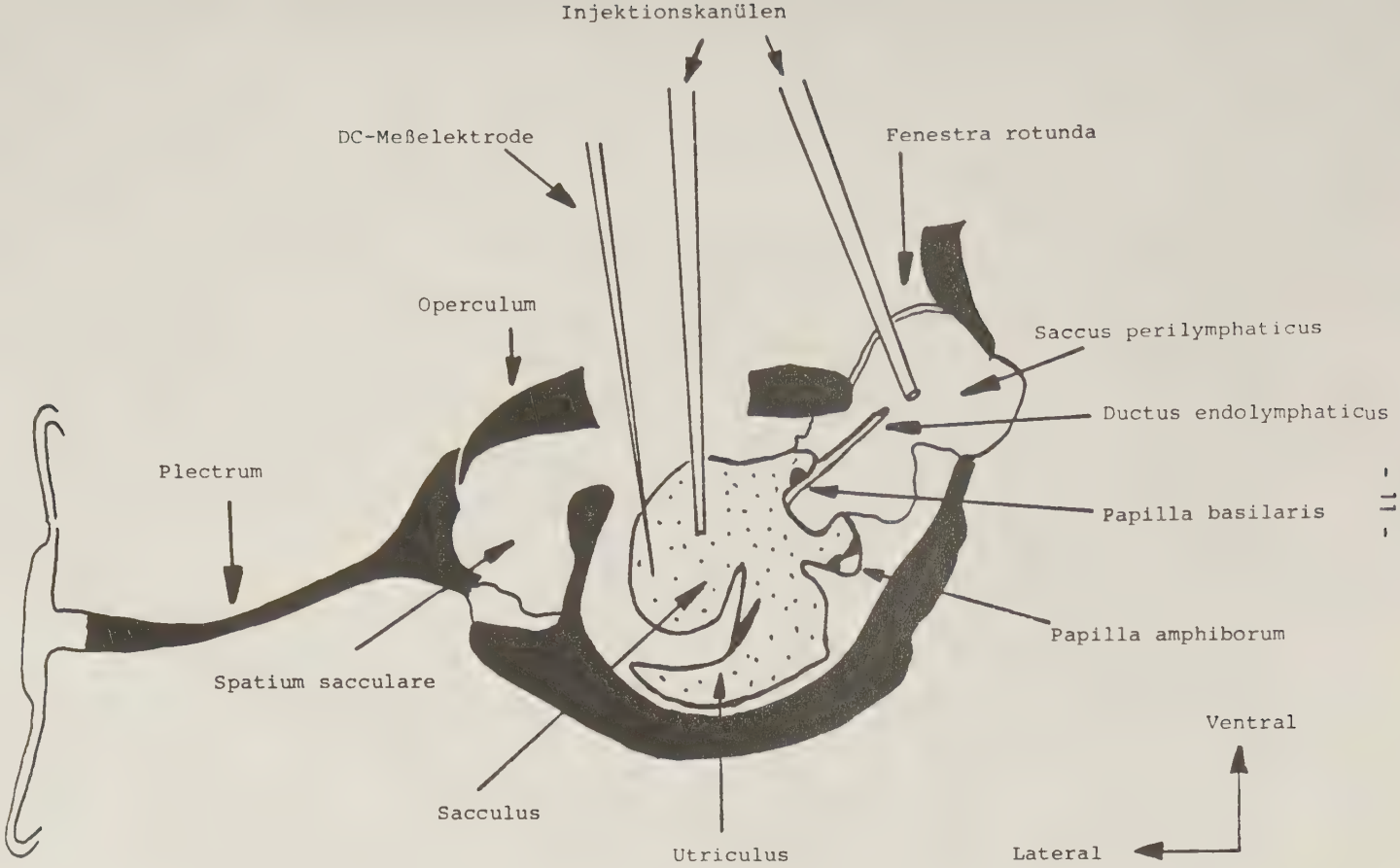
Zur intraperitonealen Applikation wurde ein Katheder in das Bauchfell des Versuchstieres gelegt und mit einer 1 ml - Spritze verbunden. Etacrynsäure und Ouabain wurden in 5 % Dextrose-Lösung oder in Froschringer-Lösung aufgelöst.

Die Injektionen ins Innenohr erfolgten durch Glaskapillaren, wie sie auch zur Herstellung der Messelektroden benutzt wurden. Über einen dünnen PVC-Schlauch mit einem Mikrodoser verbunden, wurden diese Injektionskanülen mit Hilfe eines Mikromanipulators zum Applikationsort vorgeschoben.

Zur Spülung des Perilymphraumes wurden Etacrynsäure und Ouabain in künstlicher Perilymphe folgender Zusammensetzung aufgelöst:

NaCl	117	mM
KCl	2,5	mM
$NaHCO_3$	1,2	mM
NaH_2PO_4	0,17	mM
$CaCl_2$	1,8	mM

Die Injektionskanülen mit einem Spitzendurchmesser von 80 - 100 µm wurden durch das runde Fenster in den Saccus perilymphaticus eingeführt (siehe Abbildung 3) und dort wurden 0,5 - 1 ml der jeweiligen Lösung langsam gespritzt. In Vorversuchen mit Farblösung konnte beobachtet werden wie die Injektionsflüssigkeit über das Spatium sacculare durch die operativ geschaffene Öffnung am Boden der Ohrkapsel ins Maul entwich.



Abd. 3 Frontalschnitt durch das Froschohr, modifiziert nach Wever (1973)

Bei der intraendolymphatischen Injektion in den Sacculus (siehe Abbildung 3) betrug der Spitzendurchmesser der Kapillaren 40 - 60 µm und Etacrynsäure und Ouabain wurden in künstlicher Endolymphe gelöst. Zusammensetzung:

NaCl	19,5	mM
KCl	100,0	mM
$NaHCO_3$	1,2	mM
NaH_2PO_4	0,17	mM
$CaCl_2$	1,8	mM

Nach Durchstoßen des Otolithen der Macula sacculi konnte die Position der Kanülenspitze im Sacculus nicht mehr eingesehen werden. Injektionen von Farblösungen ergaben mehrfach eine Verletzung der Sacculuswand, so daß der Farbstoff kurz nach der Injektion im Perilymphraum sichtbar wurde. Außerdem fand sich, daß maximal 0,5 - 1 µl Lösung gespritzt werden konnten, ohne eine Ruptur des Sacculus zu verursachen.

6) Histologische Präparate

Bei den Versuchstieren wurde jeweils nur der Perilymphraum eines Ohres mit der entsprechenden Lösung durchspült; das andere Ohr blieb zur Kontrolle unbehandelt. Nach Versuchsende wurden die Tiere sofort dekapitiert, beide Ohren zusammen grobmorphologisch präpariert und für mindestens 24 Stunden in 10 % Formalinlösung fixiert. Diese Präparate wurden dann wie folgt weiterbehandelt:

- Entmineralisierung in EDTA (Äthyldiaminotetraessigsäure) für 7 Tage
- gründliches Auswaschen in Wasser
- aufsteigende Alkoholreihe; anschließend Methylbenzoat bis zum Absinken des Präparates
- Einbettung des Präparates in Paraplast

Der Paraplastblock wurde mit einem d-Messer geschnitten. Es wurden Frontalschnitte mit einer Schnittdicke um 7 µm hergestellt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

III. ERGEBNISSE

A) Potentialmessungen

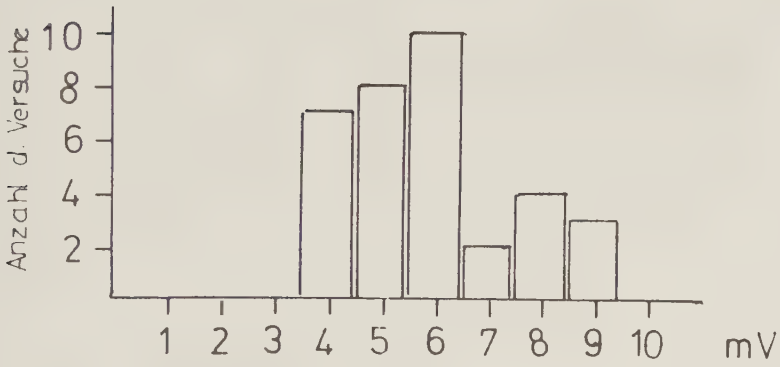
1) Messung des normalen EP beim anästhesierten Frosch

Im Innenohr des Frosches wurden nacheinander zwei Gleichstrompotentiale gemessen, zuerst zwischen Perilymphe und Referenzelektrode, dann zwischen Endolymphe und Referenzelektrode. Da der Perilymphraum als Teil des allgemeinen mesenchymalen Interzellulärraumes auf dem gleichen Spannungspotential wie die übrige Interstitialflüssigkeit liegt, d.h. die Messelektrode in der Perilymphe mit der Referenzelektrode kurzgeschlossen ist, ergibt sich die Größe des EP aus der Differenz der beiden oben genannten Potentiale.

Ehe die Messelektrode in den Sacculus eingestochen wurde, mußte 10 - 15 Minuten lang ein stabiles Potential in der Perilymphe gemessen werden. Beim Vorschieben der Elektrode auf Sacculuswand und Otolith wurde der Sacculus erst nach unten weggedrückt und schnellte dann beim Durchstich des Otolithen wieder zurück; jetzt wurde sogleich ein positiver Potentialsprung registriert. Nach wenigen Minuten hatte sich ein stabiles Potential eingestellt. In einem Teil der Versuche wurde die Elektrode lateral des Otolithen in medio-cranialer Richtung plaziert, um eine Beschädigung der Elektrodenspitze beim Durchgang durch den Otolithen zu verhindern. Vor der Weiterführung eines Versuches wurden jeweils etwa 10 Minuten lang ein konstantes Potential registriert. Der Otolith versperrte die Sicht auf die Lage der Elektrodenspitze und es konnte somit auch keine Beschädigung an der Elektrodenspitze beobachtet werden. Deshalb wurde zum Versuchsende als Kontrolle die Perilymphe mit einer 2,7 M KCl - Lösung durchspült. Das EP mußte jetzt schnell auf die Null-Linie absinken. Wenn dies nicht geschah, ist entweder ein Artefakt gemessen, oder die Elektrode im Laufe des Versuches beschädigt worden.

In 34 unten näher beschriebenen Versuchen sind zu Versuchsbeginn endolymphatische Potentiale zwischen 3,5 und 9 mV gemessen worden. (siehe Abbildung 4)

Mittelwert: 5,8 mV
Standardabweichung: ± 1,5 mV



Abd.4 Häufigkeitsverteilung des EP im Sacculus

Intraperitoneale Applikation

a) Etacrynsäure

Nr.	EP (mV)	Dosis (mg/kg)	Versuchsdauer nach Injektion (Min)	
1	4	100	36	keine Veränderung des EP
2	3,5	125	46	" " "
3	5,5	200	95	" " "
4	4,5	250	59	" " "
5	8	350	68	" " "
6	4	450	75	" " "
7	5,75	750	60	" " " Exitus nach etwa 50 Minuten, keine EP-Veränderungen in den nächsten 10 Minuten.

Etacrynsäure hatte bis zur Letaldosis von 750 mg/kg Körpergewicht keinen Einfluß auf das EP.

b) Ouabain

Nr.	EP (mV)	Dosis (mg/kg)	Versuchsdauer nach Injektion (Min)	
8	5,75	730,0	49	keine EP-Veränderung, Exitus nach 10 Min.
9	5	182,0	29	" " " " 7 Min.
10	8,5	36,0	39	" " " " 8 Min.
11	5	0,5	85	" " " " 50 Min.

Ouabain wirkte selbst in einer Dosis von 0,5 mg/kg Körpergewicht noch tödlich ohne eine Wirkung auf das EP zu zeigen. Selbst 20 - 40 Minuten nach Tod des Versuchstieres fiel das EP nicht ab.

3) Intraendolymphatische Applikation

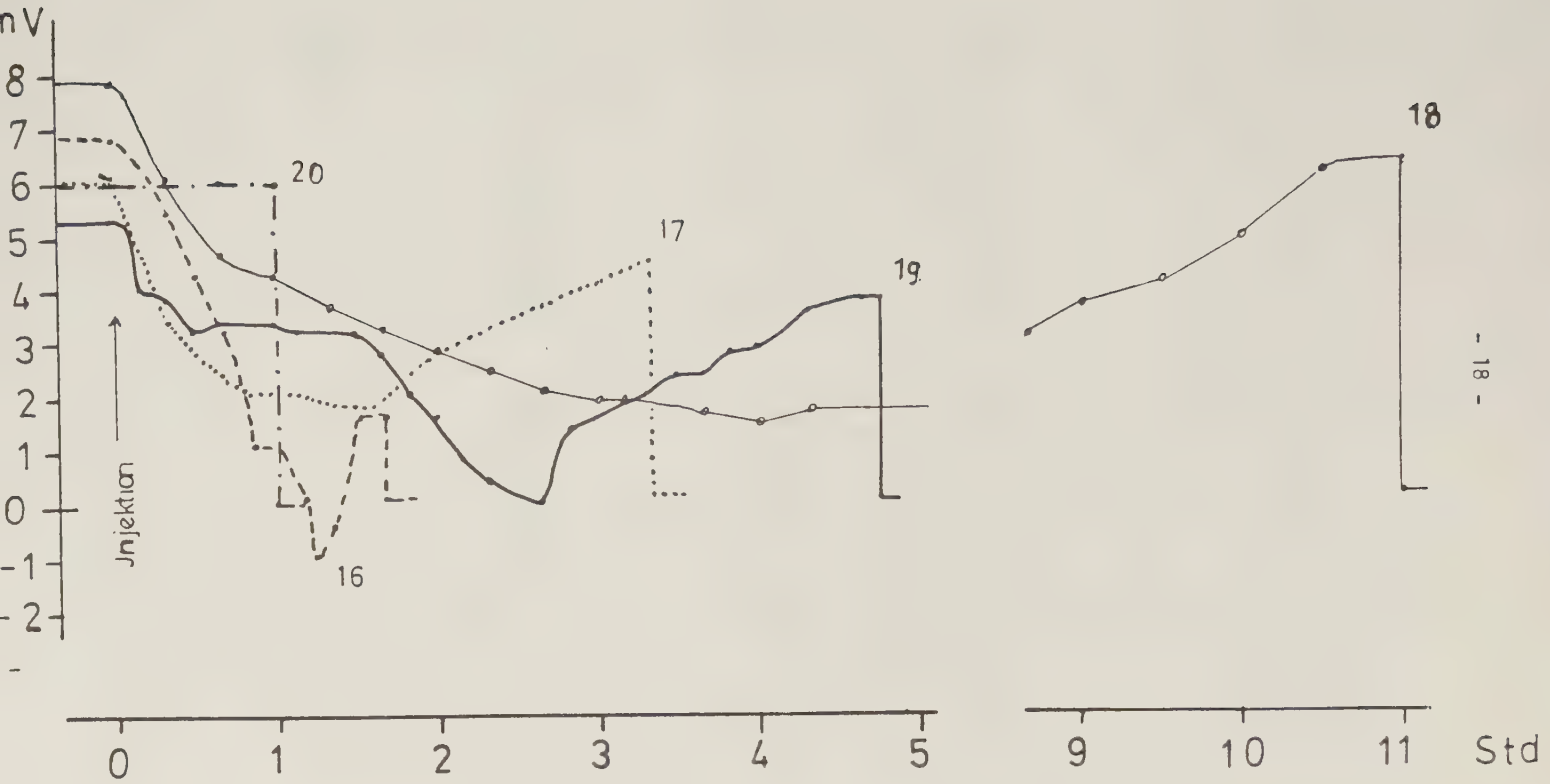
Um eine Eigenwirkung der künstlichen Endolymphe auszuschließen und eine Beeinflussung der Messung durch die angewandte Injektionstechnik festzustellen wurden künstliche Endolymphe und künstliche Perilymphe injiziert:

Nr.	EP (mV)			Versuchsdauer nach Injektion (Min)	
12	5	1 µl	künstl. Endolymphe	34	keine Veränderung d. EP
13	5 1/2	1 µl	" "	56	" " "
14	9	1 µl	" "	40	" " "
15	6	1 µl	" Perilymphe	36	Abfall u. Wiederanstieg d. EP

Während der Injektion ergaben sich manchmal kleine positive und negative Potentialschwankungen; kurz nach Beendigung der Injektion hatte sich das EP wieder auf seinem alten Niveau stabilisiert. Injektion von künstlicher Endolymphe führte innerhalb von 55 Minuten zu keiner EP-Veränderung, nach Injektion von künstlicher Perilymphe indessen sank das EP innerhalb von 20 Minuten auf 0 mV ab und stieg dann langsam an. 33 Minuten nach der Injektion waren schon wieder 50 % des Ausgangspotentials erreicht.

a) Etacrynsäure

Nr.	EP (mV)	Menge (µl)	Dosis (M)	Versuchsdauer nach Injektion (Min)	
16	6,8	1	3×10^{-3}	100	Abfall u. Wiederanstieg d. EP
17	6	1	"	195	" " "
18	7,8	1	"	660	" " "
19	5,2	0,5	6×10^{-3}	258	" " "
20	6	1	"	60	keine Veränderung



Abd. 5 Kurvenverlauf des EP im Sacculus nach Injektion von 3 x 10^{-3}M (15-18) und 6 x 10^{-3}M (19,20) Etacrynsäure in den Sacculus

Injektionen von 3 x 10^{-3}M und 6 x 10^{-3}M Etacrynsäure führten zu einem reversiblen Abfall des EP. Allerdings ergaben sich große Unterschiede in der Geschwindigkeit des Wirkungseintritts (Abfall des EP auf 50 % des Ausgangswertes nach 59 ± 30 Minuten) und der Größe des EP-Abfall (siehe Abbildung 5).

Nur in einem Versuch wurde ein negatives EP erreicht. Aufgrund der angewandten Injektionstechnik ergaben sich bei jedem Versuchstier verschiedene Konzentrationen von Etacrynsäure im Sacculus. Möglicherweise sind auch geringe Mengen der Etacrynsäure-Lösung durch feinste Risse der Sacculuswand in den Perilymphraum entwichen. Die Unwirksamkeit von Etacrynsäure in Versuch Nr. 20 läßt sich nicht erklären. In allen aufgeführten Versuchen wurde zum Schluß die Lage der Injektionskanüle im Sacculus kontrolliert und bestätigt.

b) Ouabain

Nr.	EP (mV)	Menge (µl)	Dosis (M)	Versuchsdauer nach Injektion (Min)	
21	7,5	0,8	1 x 10^{-3}	110	keine Veränderungen d. EP
22	6	1,0	1,5 x 10^{-3}	60	" "

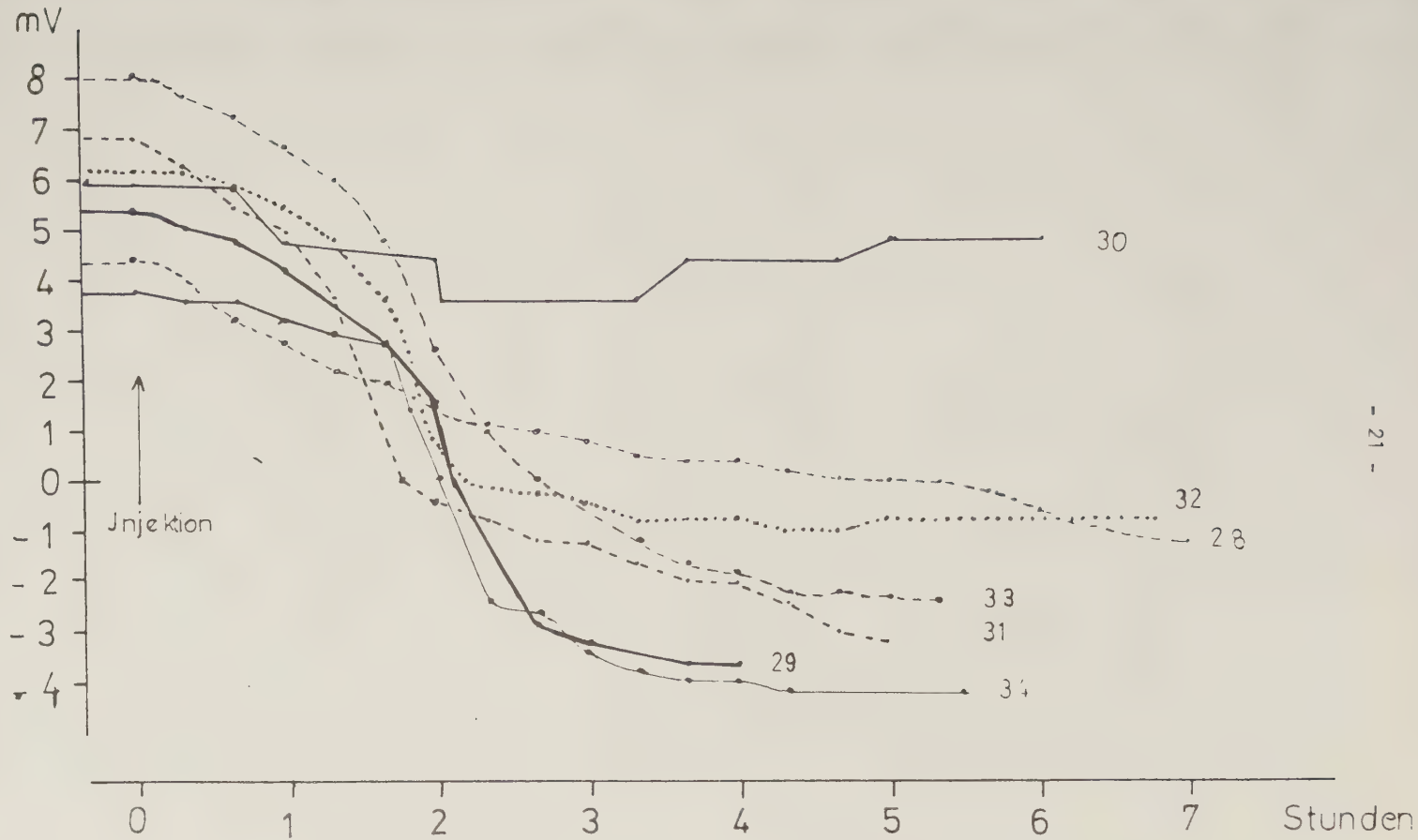
Ouabain zeigte bei intraendolymphatischer Injektion keine Wirkung.

4) Intraperilymphatische Applikation

a) Etacrynsäure

Nr.	EP (mV)	Menge (ml)	Dosis (M)	Versuchsdauer nach Injektion	
28	4,4	0,8	3×10^{-3}	10 Std. 16 Min.	Abfall d.EP auf - 3 mV
29	3,8	0,95	"	4 Std.	" " auf - 3,6 mV
30	6,0	0,95	"	13 Std. 25 Min.	nur geringfügiger Abfall d.EP
31	6,8	0,5	"	5 Std. 10 Min.	Abfall d.EP auf - 3,2 mV
32	6,2	0,4	4×10^{-2}	6 Std. 45 Min.	" " auf - 0,8 mV
33	8,0	0,6	"	5 Std. 25 Min.	" " auf - 2,4 mV
34	5,4	0,6	"	5 Std. 30 Min.	" " auf - 4,2 mV

Etacrynsäure führte in Dosen von 3×10^{-3}M und 4×10^{-2}M zu einem irreversiblen Abfall des EP auf Werte von - 0,8 bis - 4,2 mV. Nur in Versuch Nr. 30 konnte keine eindeutige Etacrynsäure-Wirkung festgestellt werden. Das EP sank innerhalb von 2 Std. nur um etwa 2,5 mV und stieg dann langsam wieder an (siehe Abbildung 6).

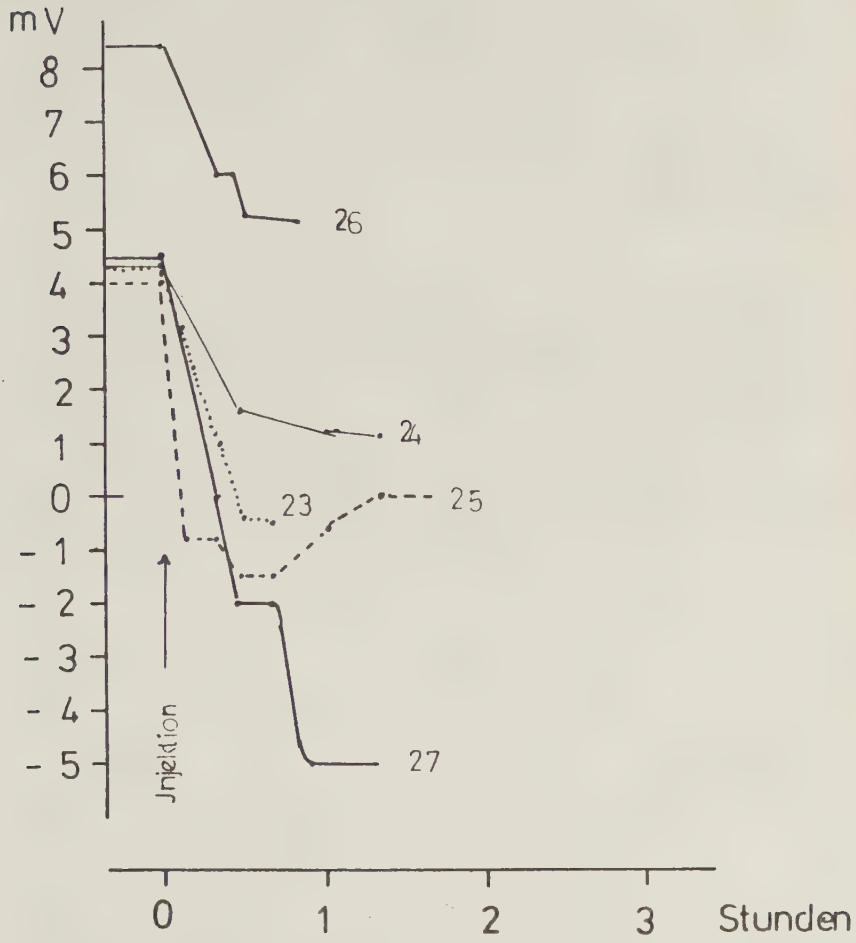


Abd. 6 Kurvenverlauf des EP im Sacculus nach Spülung des Perilymphraumes mit 3×10^{-3}M (28-31) und 4×10^{-2}M (32-34) Etacrynsäure

b) Ouabain

Nr.	EP (mV)	Menge (ml)	Dosis (M)	Versuchsdauer nach Injektion	
23	4,5	0,5	3×10^{-3}	42 Min.	Abfall auf -0,5 mV Exitus nach 8 Min.
24	4,25	0,4	"	80 Min.	Abfall auf 1,2 mV Exitus nach 7 Min.
25	4	0,9	"	86 Min.	Abfall auf -1,5 mV Exitus nach 8 Min.
26	8,5	0,9	"	42 Min.	Abfall auf 5,2 mV Exitus nach 25 Min.
27	5	0,9	"	80 Min.	Abfall auf -5 mV Exitus nach 5 Min.

Eine Spülung des Perilymphraumes mit 3×10^{-3}M Ouabainlösung führte nach etwa 8 Minuten zum Tode des Versuchstieres während das Potential weiter schnell abfiel. Dieser Potentialabfall ist nicht durch den Tod des Versuchstieres verursacht, denn das EP der Kaltblüter ist Anoxie intensiv (Schmidt u. Fernandez, 1962 und eigene Versuche Nr. 8 - 11) und selbst am isolierten Froschohr wird die Ionenkonzentration über Tage aufrechterhalten (Simon et al., 1973) (Siehe Abbildung 7).



Abd. 7 Wirkung von 3 x 10^{-3}M perilymphatisch appliziertem Ouabain auf das EP im Sacculus

B) Histologische Untersuchungen

1) Etacrynsäure

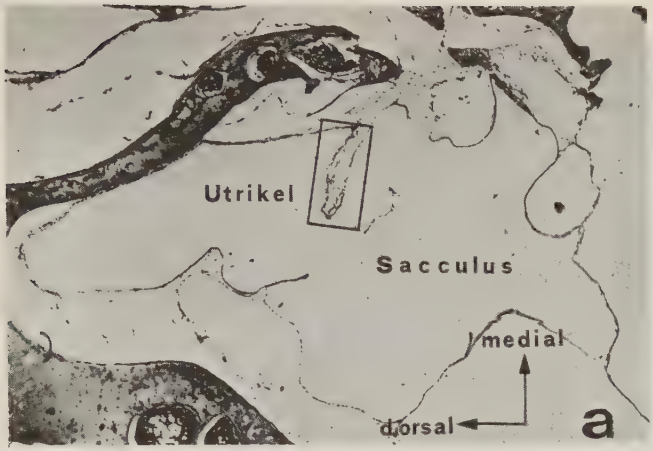
Nr.	Menge (ml)	Dosis (M)	Versuchsdauer nach Injektion	histologische Veränderungen
35	0,95	3×10^{-3}	4 Stunden	interzelluläre Ödeme im sekretorischen Epithel und Präzipitate
36	0,80	"	"	

Zum Zeitpunkt der maximalen Reduktion des EP etwa 4 Stunden nach der Spülung des Perilymphraumes mit 3×10^{-3} M Etacrynsäure zeigten sich am mehrschichtigen sekretorischen Epithel des Labyrinthorgans ausgeprägte interzelluläre Ödeme, während das einschichtige Endothel, welches Peri- und Endolymphraum voneinander trennt, gegenüber dem Kontrollohr des gleichen Versuchstieres keine Veränderungen aufweist. Zusätzlich ließen sich an der Endolymphseite der Sacculuswand ausgedehnte Präzipitate nachweisen (siehe Abbildung 8).

2) Ouabain

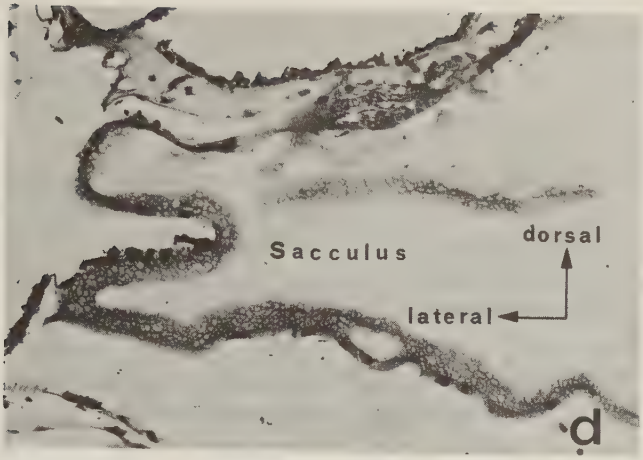
Nr.	Menge (ml)	Dosis (M)	Versuchsdauer nach Injektion	histologische Veränderungen
37	0,90	3×10^{-3}	1 Stunde	keine

Es konnten keine Veränderungen gegenüber dem Kontrollohr festgestellt werden.


Utrikel
Sacculus
medial
dorsal
a

Utrikel
b

Utrikel
c



Abd. 8 a) Querschnitt durch das linke Ohr, 4 Stunden nach Spülung des Perilymphraumes mit 3 x $1o^{-3}$ M Etacrynsäure, Vergrößerung 4o : 1

b) Ausschnitt von 8a, Papilla amphiborum, die Pfeile markieren die interzellulären Ödeme in der Dunkelzellschicht am Boden des Utrikels, Vergrößerung 25o : 1

c) Papilla amphiborum des Kontrollohres, Vergrößerung 25o : 1

d) Präzipitate an der lateralen und ventralen Sacculusinnenwand, Vergrößerung 6o : 1

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Über die Produktion von Endo- und Perilymphe werden z.Zt. folgende Vorstellungen diskutiert (Vosteen, 1976): Der Endolymphraum, eine ektodermale Einstülpung und Abschnürung bildet ein allseitig geschlossenes System, wobei die Wandepithelzellen fest durch Zonulae occludentes miteinander verbunden sind. Die Perilymphräume hingegen sind ein Teil des mesenchymalen Interzellulärraumes; damit ist die Perilymphe auch nichts anderes als Interzellulärflüssigkeit, also ein Ultrafiltrat des Plasma. Es gibt keine Sekretion der Endolymphe aus spezifischen Zellen (z.B. Stria vascularis - Zellen, Dunkelzellen des Gleichgewichtsorgan), sondern die Endolymphe ist überwiegend ein Filtrat aus der Perilymphe, wobei der rasche Wasserübertritt durch die Membran von den osmotischen Druckverhältnissen gesteuert wird. Im Innenohr ist der osmotische Druck hauptsächlich abhängig von den unterschiedlichen Ionenkonzentrationen (Natrium, Kalium u. Chlorid) in Endo- und Perilymphe. Das am Säugetier gemessene EP und die nach der Nernst'schen Gleichung berechneten Gleichgewichtspotentiale stimmen für keine der aufgeführten Ionen überein. Sie müssen also aktiv gegen ihren Konzentrationsgradienten gepumpt werden. Das EP gilt als Anzeiger für diesen Transport von Elektrolyten durch die Epithelwände.

Die Versuche von Bosher (1973), Sellick u. Johnstone (1975) und Kusakari et al. (1978) konnten zeigen, daß Etacrynsäure einen starken Abfall des EP auf Werte von - 40 mV bewirkte, die bislang nach Hypoxie oder Ouabain-Gabe noch nicht gemessen wurden und nach deren gleichzeitiger Applikation (Sellick u. Johnstone 1975) ein Wiederanstieg des negativen Potential beobachtet wurde. Außerdem bewirkte Etacrynsäure

einen Abfall der Kaliumkonzentration und einen Anstieg der Natriumkonzentration in der Endolymphe (Bosher, 1977). Ein Natriumdiffusionspotential (Sellick u. Johnstone, 1972) oder ein rheogener Chloridtransport (Sellick u. Bock, 1974) konnten als Ursache des EP ausgeschlossen werden.

Aus diesem Grunde haben Sellick und Johnstone (1975) für die Pumpfunktion der marginalen Striazelle ein Modell entwickelt, welches eine rheogene Na-K-Pumpe an der basolateralen Seite der marginalen Striazelle beinhaltet, während an der luminalen, d.h. der Endolymphseite eine reine Kaliumpumpe postuliert wurde. Dabei sollte Etacrynsäure eine Hemmung der K-Pumpe an der luminalen Seite des Epithels bewirken und möglicherweise auch die Na^+-K^+-ATPase an der serosalen Seite beeinflussen. Gekoppelt ist ein derartiger Mechanismus an einen hohen Energieverbrauch und damit Sauerstoffverbrauch wie er in der Stria vascularis des Meerschweinchens von Chou und Rogers (1962) gemessen wurde. Nach dieser Hypothese setzt sich das EP aus

1) einer elektronegativen Na^+-K^+-Austauschpumpe
2) einer elektropositiven K^+-Pumpe
3) einem negativen K^+-Diffusionspotential

zusammen.

Die toxische Wirkung von Etacrynsäure auf Utrikel und Bogengänge sind bisher kaum untersucht worden; auch berichten die klinischen Fallbeschreibungen hauptsächlich von Schwerhörigkeit und Taubheit, aber nur selten von Gleichgewichtsstörungen.

Sellick und Johnstone (1975) konnten bei intravenöser Applikation von Etacrynsäure keine Wirkung auf das EP des Utrikel feststellen, erst bei Perfusion der Perilymphe mit 10^{-3}M Etacrynsäure konnten sie einen Abfall des EP auf Werte von - 40 mV registrieren. Demgegenüber konnten Kusakari u. Thalmann (1976) einen Abfall des EP in der Ampulle auf negative Werte nach intravenöser Injektion von Etacrynsäure nachweisen. Diese Veränderung des EP trat aber erst bei hohen Dosen und mit Verzögerung ein: Eine Dosis 70 mg/kg Körpergewicht führte erst nach 90 Minuten zu einem Potentialabfall und nach 150 Minuten wird ein maximal negatives Potential von - 5 mV erreicht. In der Ampulle wird ein Potentialabfall auf - 32 mV erst bei einer Dosis von 100 mg/kg nach etwa 70 Minuten erreicht; in der Cochlea führt eine Dosis von nur 50 mg/kg schon nach 10 - 15 Minuten zu einem vergleichbaren Potentialabfall. Sellick u. Johnstone (1975) haben nur mit Dosen von 42 - 66 mg/kg gearbeitet und außerdem das EP im Utrikel nur über 30 Minuten verfolgt; sie konnten somit einen Potentialabfall nicht erfassen.

Die Wirkungsunterschiede von Etacrynsäure an der Cochlea und dem Vestibularapparat lassen sich durch die geringe Gefäßversorgung des Vestibularapparates erklären, so daß wirksame Konzentrationen von Etacrynsäure nur verzögert herangebracht werden können. Zur Aufrechterhaltung der endolymphatischen Ionenkonzentration ist die Gefäßversorgung des Gleichgewichtsorgan, wie Dohlman (1968) zeigen konnte, ausreichend.

Ischämie bzw. Anoxie hat in Ampulle und Utrikel eine ähnliche Wirkung auf das durch Etacrynsäure induzierte maximal negative EP wie in der Cochlea. Es erfolgt ein schneller Anstieg auf weniger negative Werte von - 20 mV bis - 15 mV; nach einer Plateauphase ein langsamer Anstieg gegen O mV (Kusakari u. Thalmann, 1976; Sellick u. Johnstone, 1975). Am geringer differenzierten Endothel des Vestibularapparates scheinen in den Dunkelzellen die gleichen Ionenpumpen wie in der Stria vascularis zu existieren.

Entsprechend der EP-Veränderung in der Ampulle wurde auch der periphere vestibuläre Nystagmus unterdrückt. Die Wirkung setzte bei Dosen 50 mg/kg nach ungefähr 30 Minuten ein und nach etwa 120 Minuten war der maximale Effekt zu beobachten (Kusakari et al., 1979). Demgegenüber berichteten Levison et al. (1974) und Mathog (1977) von einer sofort einsetzenden, reversiblen Depression des kalorisch provozierten Nystagmus. Bei Dosen von 20 mg/kg trat diese toxische Wirkung von Etacrynsäure innerhalb von 5 Minuten ein und war schon nach 30 Minuten nicht mehr zu registrieren. Eine Erklärung für diese Wirkungsunterschiede steht noch aus. Der Verweis auf Spezies-Unterschiede erscheint nicht stichhaltig, wesentlicher sind die methodischen Schwierigkeiten, die Mathog (1977) angibt.

Vergleicht man das einfache, einschichtige Endothel des Froschinnenohres mit der komplizierter aufgebauten Säugetier-Stria vascularis, so fehlt eine starke Vaskularisation des Endolymphraumes, obwohl auch die Endolymphe des Frosches eine hohe Kalium-Konzentration enthält:

Ionenkonzentrationen in Peri- und Endolymphe des Froschohres

	Perilymphe	Endolymphe	Gleichgewichtspotential
Na^+ (mEq/l)	a) 98,7 ± 12,8 b) 114,57 ± 7,1	a) 17,6 ± 10,8 b) 20,6 ± 6,8	+ 45,5 mV
K^+ (mEq/l)	a) 3,6 ± 1 b) 2,78 ± 0,74	a) 106,7 ± 18,7 b) 106,4 ± 14,0	- 88,5 mV
Cl^- (mEq/l)	a) 82,7 ± 7,0	a) 105,9 ± 11,0	+ 6,2 mV

a) Simon et al. (1973) b) Schulze (1969)

Das Gleichgewichtspotential wurde aus der Nernst'schen Gleichung errechnet:

$$E = \frac{R \cdot T}{F \cdot Z} \ln \frac{Konz_{Peril.}}{Konz_{Endl.}} \quad \text{(bei 18°C)}$$

R - Gaskonstante
T - absolute Temperatur
F - Faraday'sche Konstante
Z - Valenz des Ion.

Eine hohe Kalium-Konzentration in der Endolymphe des Froschbogenganges ist unerläßlich zur Aufrechterhaltung der Ruheaktivität der Ampullarrezeptoren. Valli et al. (1977) stellten bei vollständiger Entfernung von Kalium aus Peri- und Endolymphe eine Unterdrückung der Rezeptorfunktion fest. Zur Aufrechterhaltung einer minimalen Rezeptorfunktion war bei K^+-freier Perilymphe eine K^+-Konzentration in der Endolymphe von wenigstens 20 mM nötig. Bei K^+-freier Endolymphe war eine geringe K^+-Konzentration von 0,25 mM in der Perilymphe ausreichend. K^+-Ionen müssen also aktiv durch die Bogengangswand von der Perilymphe in die Endolymphe transportiert werden. Dies ergibt sich auch aus der Berechnung der Gleichgewichtspotentiale. Nur für Chlorid stimmt das nach der Nernst'schen Gleichung berechneten Potential von 6,2 mV mit dem gemessenen EP von 5,8 mV überein. Die Chloridverteilung läßt sich nach diesen Ergebnissen durch Diffusionsvorgänge erklären, während für Kalium mit einem Gleichgewichtspotential von - 88,5 mV und Natrium mit einem Gleichgewichtspotential von 45,5 mV ein aktiver Transport angenommen werden muß.

Ein mögliches Transportsystem ist die in allen tierischen Zellen vorhandene Na^+-K^+-ATPase (Keynes, 1973). Sie wird spezifisch durch Ouabain gehemmt. Bei den Versuchen von Taglietti et al. (1975) am Froschbogengang wurde das Generatorpotential der Crista ampullaris in K^+-freier Lösung und in Gegenwart von 2×10^{-2}M Ouabain reduziert. Die Wirkung von Ouabain auf die Elektrolyt-Zusammensetzung der Froschendolymphe und die Verteilung der ATPase im Innenohrendothel haben Simon et al. (1973) untersucht. Sie kamen dabei zu folgenden Ergebnissen:

a) isolierte Froschinnenohren konnten ihre endolymphatischen Ionenkonzentrationen bei einer Inkubationstemperatur von 1°C über 6 Tage unverändert aufrecht erhalten.

b) enthielt das Inkubationsmedium aber 10^{-3}M Ouabain fiel in der Endolymphe die Kaliumkonzentration ab und stieg die Natriumkonzentration an. Histologisch wurde eine Obliteration der Interzellulärräume auf der Perilymphseite des Endothels beobachtet.

c) die Dunkelzell-Zonen - gekennzeichnet durch hohe Enzymaktivitäten (Hagmann u. Giebel, 1978; Kusakari und Thalmann, 1976) - besitzen auf der Endolymphseite Mikrovilli, während die perilymphatische Oberfläche durch starke Faltungen sehr viel größer ist.In den histochemischen Untersuchungen konnte ATPase nur entlang der perilymphatischen Membran dieser Zellen nachgewiesen werden, aber nicht im Innern der Zellen oder auf der Endolymphseite.

Da Ouabain die Na^+-K^+-ATPase nur auf der Seite hemmt, zu der Natrium herausgepumpt wird, ist es jetzt verständlich, daß eine endolymphatische Applikation von Ouabain keine EP-Veränderungen bewirkte (Versuch Nr. 21, 22), sondern nur eine Perfusion der Perilymphe zu einem EP-Abfall führte (Versuch Nr. 22 - 27). Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Konishi u. Mendelsohn (1970) am Meerschweinchen und Matsuura et al. (1971) am Goldfisch.

Lichtmikroskopisch konnten nach Ouabaingabe keine morphologischen Veränderungen am Endothel des Froschinnenohres nachgewiesen werden (Versuch Nr. 37).
Dies steht nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Simon et al.(1973), da die dort beschriebenen Veränderungen nur elektronenmikroskopisch sichtbar waren.

Zahlreiche Untersuchungen konnten eine Beeinflussung des Elektrolyttransportes durch Etacrynsäure an unterschiedlichsten Zellsystemen verschiedener Tierarten nachweisen. Die diuretische Wirkung von Etacrynsäure wird durch eine Hemmung des aktiven Chlorid-Transportes im aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife verursacht (Burg, 1976; Cunarro u. Weiner, 1978); in Erythrozyten (Motais u. Cousin, 1976) und in der Frosch Cornea (Candia, 1973) wird ebenfalls der aktive Cl-Transport gehemmt. An der Magenschleimhaut des Frosches konnte eine Permeabilitätsänderung für Kalium und Chlorid festgestellt werden (Dinno u. Schwartz, 1973). Etacrynsäure beeinflußt aber auch den Natriumtransport. Beim Kaltblüter konnte dies an der Haut (Eigler et al., 1966), der Blase (Shakhmatova u. Natochin, 1977), der Niere (Natochin u. Lavrova, 1974) und am Muskel (Riordan et al., 1971, Erlij u. Leblanc, 1971) nachgewiesen werden.

Über die zellulären Wirkungsmechanismen von Etacrynsäure besteht noch keine Gewissheit. Es ergaben sich wesentliche Unterschiede zwischen in vivo- und in vitro-Messungen. In der Niere konnte eine Wirkung auf die Na^+-K^+-ATPase in diuretisch wirksamen Dosen von Etacrynsäure ausgeschlossen werden (Landon u. Fitzpatrick, 1972; Sejersted et al.,1978). Auch im Innenohr entstehen die toxischen Etacrynsäurewirkungen nicht durch eine spezifische Hemmung der Na^+-K^+-ATPase (Kuijpers u. Wilbert, 1976; Paloheimo u. Thalmann, 1977). In hohen Dosen von 10^{-2}M werden Na^+-K^+- und Mg^{++}-ATPase jedoch unspezifisch gehemmt. Thalmann et al. (1975) sehen in der Störung der Energieverwertung und einer Änderung der Energiebereitstellung die Hauptfaktoren der akuten Etacrynsäure-Intoxikation. Zugleich erfolgt eine Änderung der Membranpermeabilität. Diese Veränderung des Zellmetabolismus werden nach der Ansicht von Paloheimo u. Thalmann (1977) über eine Hemmung des Adenylzyklase-Cyclo 3'5'-AMP-Systems bewirkt.

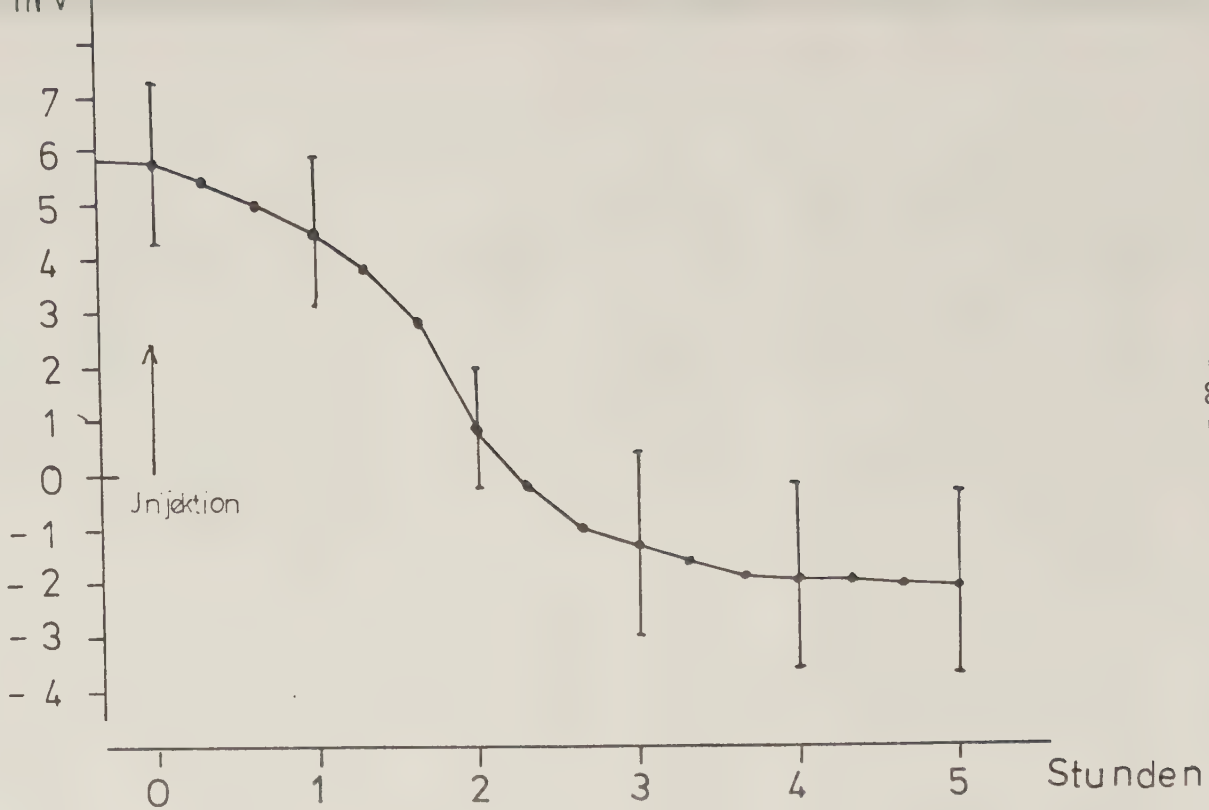
Die Versuche (Nr. 1 - 7) mit Injektion von Etacrynsäure in den Peritonealraum zeigten, daß eine wirksame Konzentration am Endothel des Endolymphraumes nicht auftritt, es vielmehr vorher zum Tod des Tieres durch Eigenwirkung von Etacrynsäure kommt, ohne daß das EP beeinflußt wird. Dieser Befund kann auf zweierlei Weisen interpretiert werden:

1) Es besteht keine ausreichende Vaskularisation des Endothels der Endolymphe des Froschohres, so daß wirksame Konzentrationen von Etacrynsäure nicht herangebracht werden können.

2) Die Wirkung von EA am Endothel findet nicht statt.

Somit erscheinen Versuche mit direkter Applikation der Substanz am Wirkungsort zwingend. Die intraendolymphatische Injektion von 10^{-3}M Etacrynsäure zeigt einen reversiblen Abfall des EP (Abbildung 5), so daß der Effekt bei hohen Dosen auch für EA am Froschepithel nachgewiesen werden kann.

Der Beweis einer direkten Wirkung durch intraendolymphatische Applikation läßt jedoch nicht sicher eine artifizielle Beeinflussung des EP ausschließen, so daß die Applikation von außen, d.h. in die Perilymphe (Versuche Nr. 28 - 34) Aufschluß darüber geben sollte, ob eine direkte Wirkung am Endothel nachweisbar ist. In Konzentration von 3×10^{-3}M und 4×10^{-2}M bewirkt auch hier Etacrynsäure einen Abfall des EP (siehe Abbildung 9), woraus sich schließen läßt, daß eine Wirkung am Endothel nachweisbar ist und somit der Schluß gerechtfertigt ist, daß die Vaskularisation des endolymphatischen Endothels am Frosch besonders unzureichend ist.



Abd. 9 Wirkung von perilymphatisch applizierter Etacrynsäure auf das EP im Sacculus (Durchschnitt aus 6 Versuchen)

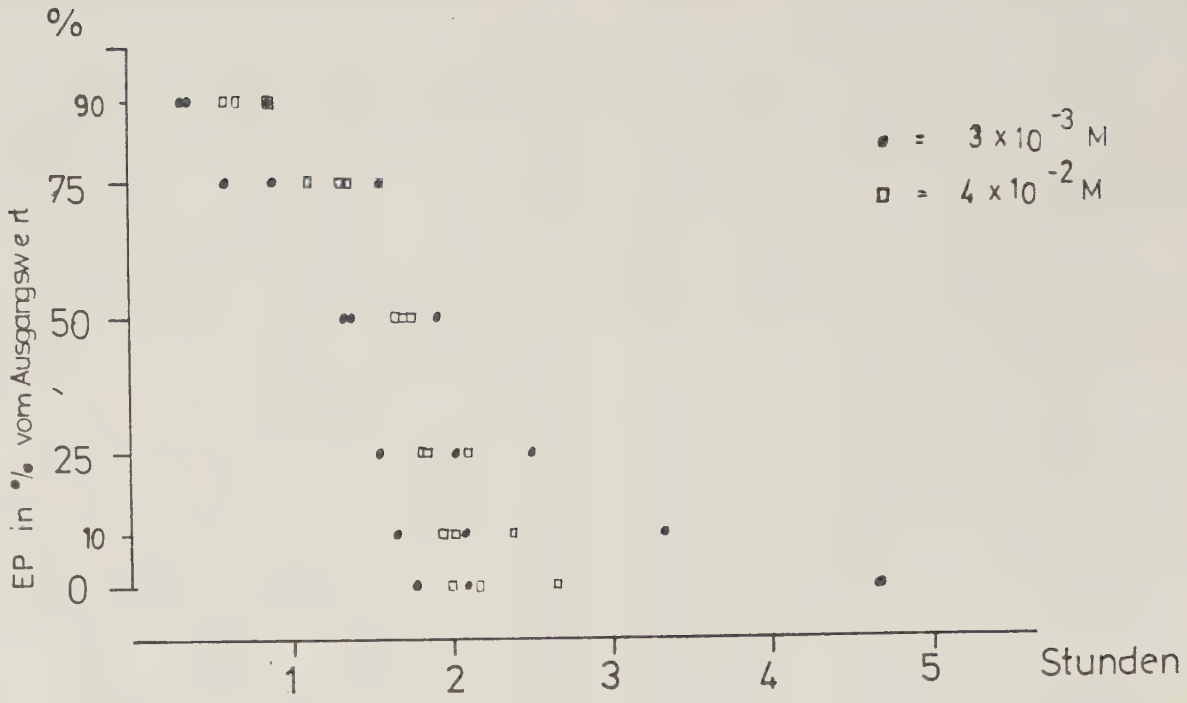
Im Gegensatz zur intraendolymphatischen Applikation führt die perilymphatisch applizierte Etacrynsäure zu einem irreversiblen EP-Abfall. Durch starke Verdünnung der in den Sacculus injizierten kleinen Mengen wurden dort geringere Konzentrationen von Etacrynsäure erreicht als durch Spülung des Perilymphraumes und führten so nur zu einer schwächeren Wirkung. Die je verschiedenen Etacrynsäure-Konzentrationen im Sacculus zeigen sich auch am sehr unterschiedlichen Verlauf des EP-Abfall (siehe Abbildung 5).

Das Ergebnis der Wirkung von Etacrynsäure bei perilymphatischer und endolymphatischer Applikation läßt den Schluß zu, daß Etacrynsäure direkt am Endothel wirkt. Dies ist auf zwei Wegen möglich:

1) spezifisch, durch Hemmung eines Transportprozesses

2) unspezifisch, durch Änderung der Permeabilität.

In Abbildung 10 sind für die Versuche 28, 29, 31-34 der prozentuale EP-Abfall vom jeweiligen Ausgangswert und die dazu benötigte Zeit gegeneinander aufgetragen. Es ergibt sich kein Wirkungsunterschied zwischen Dosen von 3×10^{-3} und 4×10^{-2}M Etacrynsäure. Aufgrund dieser fehlenden Beziehung zwischen Dosis und Wirkung handelt es sich hierbei um einen unspezifischen Effekt, der auch bei diesen hohen Dosen anzunehmen ist. Somit kann man aus den Ergebnissen schließen, daß bei der Wirkung von Etacrynsäure auf das Epithel des Endolymphraumes auch eine unspezifische permeabilitätssteigernde Wirkung der Etacrynsäure nachweisbar ist und der Effekt der Senkung des EP nicht allein in einer Hemmung einer spezifischen Pumpfunktion besteht.



Abd. 10 Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen 3 x 10^{-3}M und 4 x 10^{-2}M Etacrynsäure

Etacrynsäure führt an der Stria vascularis schon 2 - 3 Minuten nach der Injektion zu Ödembildung und zu Veränderungen am Zytoplasma der Marginalzellen. Die Intermediärzellen erscheinen durch die Ansammlung von Extrazellulärflüssigkeit geschrumpft und atrophisch (Horn et al., 1977). Bosher et al. (1973) und Brummet et al. (1977) erklären die Ödembildung durch die Ansammlung einer hypertonen Extrazellulärflüssigkeit, wobei in dieser Ödemflüssigkeit keine bedeutsame Menge an Proteinen nachgewiesen werden konnte. So ist es wahrscheinlich, daß diese Flüssigkeit durch eine Ionenakkumulation hypertonisch geworden ist; insbesondere da Etacrynsäure den Ionentransport über Zellmembranen hemmt. Mit dem Wiederanstieg des EP bilden sich auch teilweise die morphologischen Veränderungen zurück (Morgenstern et al., 1977).

Am Froschohr ergaben die eigenen histologischen Untersuchungen (Versuch 35,36) den oben aufgeführten Veränderungen am Säugetierohr entsprechende Befunde: Es zeigte sich 4 Stunden nach der Spülung des Perilymphraumes mit 3×10^{-3} M Etacrynsäure eine ausgeprägte interzelluläre Ödembildung am mehrschichtigen sekretorischen Epithel, während das einschichtige Endothel im wesentlichen unverändert blieb (siehe Abbildung 8).
Diese pathologische Akkumulation von Extrazellulärflüssigkeit im Epithel ist ein deutliches Zeichen für die Störung des Ionentransportes zwischen Perilymph- und Endolymphraum, zumal zu diesem Zeitpunkt die gleiche Etacrynsäurekonzentration einen maximalen EP-Abfall bewirkt (siehe Abbildung 9). Die Präzipitate an der Sacculusinnenwand lassen sich durch die Etacrynsäure bedingten Elektrolytverschiebungen und der dadurch bewirkten Änderung des Löslichkeitsproduktes der in der Endolymphe gelösten Salze erklären.

Nach den Ergebnissen dieser Untersuchung läßt sich das Ionentransport-Modell von Sellick u. Johnstone (1975) auch auf die Dunkelzellen des Froschinnenohres übertragen. Nimmt man jedoch eine hohe Durchlässigkeit der Endolymphmembran für Kalium-Ionen und eine relative Undurchlässigkeit der basolateralen Membran für alle Ionen an, so reicht möglicherweise die Na^+-K^+-ATPase dieser Membran zur Aufrechterhaltung des Ionenkonzentrationsgradienten zwischen Endo- und Perilymphe aus.

In diesen und ähnlichen Modellvorstellungen wird die Zelle, an und in der die Transportvorgänge ablaufen wie eine "blackbox" behandelt (Macknight, 1977). Leitfähigkeit und Potentialdifferenz sind bisher nur über das Endothel oder über Zellschichten gemessen worden, aber nicht jeweils quer durch die luminale oder basale Membran der entsprechenden Zellen. Auch ist nichts über die thermodynamische Aktivität der Ionen in der Zelle bekannt. Bei der bisher üblichen Errechnung der Ionenkonzentration im Cytoplasma aus dem gemessenen Ionengehalt des Trockengewebes, wird stillschweigend eine vollständige Lösung der bestimmten Ionen im Zellwasser vorausgesetzt, ohne eine Anreicherung in Zellorganellen oder eine Proteinbindung zu berücksichtigen. Erst wenn in der Zukunft verfeinerte Messtechniken diese erforderlichen Messungen in der Zelle ermöglichen, ist eine genauere Beschreibung der Transportvorgänge und eine Zuordnung an die jeweilige Zellmembran möglich.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Am Endolymphraum des Frosches, der über keine Stria vascularis verfügt, wurde die Wirkung von Etacrynsäure und Ouabain nach intraperitonealer, intraendolymphatischer und intraperilymphatischer Applikation untersucht.
Etacrynsäure bewirkte lediglich bei endolymphatischer und perilymphatischer Applikation eine Senkung des EP. Im Gegensatz zu den Messungen am Gleichgewichtsorgan des Säugetierohres zeigte sich am Froschohr nur ein langsamer EP-Abfall auf Werte von -0,8 bis -4,2 mV, statt auf einen Wert von etwa -40 mV wie am Säugetierohr.
Ouabain führte lediglich bei perilymphatischer Applikation zu einem EP-Abfall, wobei dieser Effekt im Gegensatz zur Etacrynsäure rasch einsetzte. Anoxie bewirkte innerhalb von 40 Minuten keine Änderung des EP.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen ergaben 1 Stunde nach Ouabaingabe keine morphologischen Veränderungen gegenüber dem Kontrollohr; 4 Stunden nach Etacrynsäuregabe zeigten sich interzelluläre Ödeme im mehrschichtigen sekretorischen Epithel des Labyrinthorgans.

Der im Vergleich zu den Säugetieren verzögert einsetzende und geringfügige EP-Abfall im Froschohr nach Etacrynsäuregabe und die mangelnde Dosis-Wirkungsbeziehung lassen sich eher mit einer unspezifischen Änderung der Membranpermeabilität erklären, als mit der Hemmung eines spezifischen Ionentransportsystems durch Etacrynsäure. Die unterschiedlichen Reaktionen von Warmblüter- und Kaltblüterohr auf Etacrynsäure und Anoxie lassen auf verschiedenartige Transportmechanismen am Innenohrendothel schließen.

Literaturnachweis

Anniko M.: Reversible and irreversible changes of the stria vascularis. Acta Otolaryngol 85, 349-359 (1978)

Barjon P., Fourcade J., Mimram A.: Surdité transitoire et acide éthacrynique. Sem. hop. Paris 48, 993-996 (1972)

Bosher S.K., Smith C., Warren R.L.: The effects of ethacrynic acid upon the cochlear endolymph and stria vascularis. Acta Otolarnyng 75, 184-191 (1973)

Bosher S.K.: Ethacrynic acid ototoxicity as a general model in cochlear pathology. Adv. Oto-Rhino-Laryng. 22, 81-89 (1977)

Brummet R., Smith C.A., Ueno Y., Cameron S., Richter R.: The delayed effects of ethacrynic acid on the stria vascularis of the guinea pig. Acta Otolaryngol 83, 98-112 (1977)

Burg M.B.: Mechanisms of action of diuretic drugs. in: Brenner B., Rector F.C, ed.: The Kidney 737-762, Philadelphia (1976)

Candia O.A.: Short-circuit current related to active transport of chloride in frog cornea: effects of furosemide and ethacrynic acid. Biochim. Biophys. Acta, 298, 1011-1014 (1973)

Carmody J.P., Sauer E.P., Gladney J.: Reversible hearing loss due to ethacrynic acid in occult renal failure. Missouri Medicine 70, 307-309 (1973)

Chou J.T.Y., Rodgers K.: Respiration of tissues lining the mammalian membranous labyrinth. J.Laryngol Otol 76,341-351 (1962)

Cunarro J.A., Weiner M.W.: Effects of ethacrynic acid and furosemide on respiration of isolated kidney tubules: the role of ion transport and the source of metabolic energy. J. Pharmacol. Exp. Ther. 206, 198-206 (1978)

Dinno M.A., Schwartz M., Olson A.K., Carasquer G.: Effects of ethacrynic acid on frog gastric mucosa in chloride solutions. Pharmacol. 52, 166-173 (1974)

Dohlmann G., Radomski M.W.: The ion selective function of the epithelium of the membranous canal walls. Acta oto-laryng 66, 409-416 (1968)

Ecker A., Wiedersheim R., Gaupp E.: Anatomie des Frosches, 3 Bde. 2. Auflage Braunschweig (1904)

Eigler J., Carl H., Edel H.H.: Der Einfluß von Etacrynsäure und Furosemid auf Membranpotential und Kurzschlußstrom an der Krötenhaut. Klin.Wschr., 44, 417-422 (1966)

Erlij D., Leblanc G.: The effects of ethacrynic acid and other sulphydryl reagents on sodium fluxes in frog muscle. J.Physiol, 214, 327-347 (1971)

Hagmann B., Giebel W.: Enzymhistochemische Untersuchungen am Innenohr des Frosches (Rana temporaria). Arch. Oto-Rhino-Laryngol. 220, 89-103 (1978)

Horn K.L., Langley L.R., Gates G.A.: Effect of Ethacrynic acid on the stria vascularis. Arch Otolaryngol 103, 539-541 (1977)

Keynes R.D.: Comparative aspects of transport through epithelia. in: Ussing H.H., Thorn N.A., ed.: Transport Mechamisms in Epitheliae, 505-511, Munksgaard, Copenhagen (1973)

Konishi T., Mendelsohn M.: Effect of ouabain on chochlear potentials and endolymph composition in guinea pigs. Acta Otolarnyng 69, 192-199 (1970)

Kuijpers W., Wilberts D.P.C.: The effect of ouabain and ethacrynic acid on ATPase activities in the inner ear of the rat and guinea pig. ORL 38, 321-327 (1976)

Kusakari J., Thalmann R.: Effects of anoxia and ethacrynic acid upon ampullar endolymphatic potential and upon high energy phosphates in ampullar wall. Laryngoscope 86, 132-147 (1976)

Kusakari J., Ise I., Comegys T.H., Thalmann I., Thalmann R.: Effect of ethacrynic acid, furosemide, and ouabain upon the endolymphatic potential and upon high energy phosphates of the stria vascularis. Laryngoscope 88, 12-37 (1978)

Kusakari J., Sato Y., Kobayashi T., Saijo S., Kawamoto K.: Effect of ethacrynic acid upon the peripheral vestibular nystagmus. Adv. Oto-Rhino-Laryng. 25, 178-183 (1979)

Landon E.J., Fitzpatrick D.F.: Ethacrynic acid and kidney cell metabolism. Biochem. Pharmacol. 21, 1561-1568 (1972)

Levinson R.M., Capps M.J., Mathog R.H.: Ethacrynic acid, furosemide, and vestibular caloric responses. Ann Otol 83, 223-229 (1974)

Macknight A.D.C.: Epithelial transport of potassium. Kidney International 11, 391-414 (1977)

Maher J.F., Schreiner G.E.: Studies on ethacrynic acid in patients with refractory edema. Ann.Int.Med. 62, 15-29 (1965)

Mathog R.H.: Vestibulotoxicity of ethacrynic acid. Laryngoscope 87, 1791-1808 (1977)

Matsuura S., Ikeda K., Furukawa T.: Effects of Na^+, K^+, and ouabain on microphonic potentials of the goldfish inner ear. Jap.J.Physiol., 21, 563-578 (1971)

Matz G.J.: The ototoxic effects of ethacrynic acid in man and animals. Laryngoscope 86, 1065-1086 (1976)

Morgenstern C., Arnold W., Thorn L., Schinko I. : Morphologische und funktionelle Veränderungen am Innenohr nach Vergiftung mit Ethacrynsäure und Atoxyl. Arch. Oto-Rhino-Laryng. 206 (1977)

Morrison J.C., Fort A.T., Fish S.A.: Diuretic induced ototoxicity in preeclamsia. J. Tenn.Med.Assn. 64, 36-37 (1971)

Motais R., Cousin J.L.: Inhibitory effect of ethacrynic acid on chloride permeability. Am.J.Physiol. 231, 1485-1489 (1976)

Nakai Y.: Electron microscopic study of the inner ear after ethacrynic acid intoxication. Pract.oto-rhino-laryng.33, 366-376 (1971)

Natochin Y.V., Lavrova E.A.: The action of diuretics on sodium transport in the frog kidney and skin. Byul. Eksp.Biol.Med. 77, 63-66 (1974)

Paloheimo S., Thalmann R.: Influence of "loop" diuretics upon Na^+ K^+ - ATPase and adenylate cyclase of the stria vascularis. Arch.Oto-Rhino-Laryng. 217, 347-358 (1977)

Pillay K.G., Schwarz F.D., Aimi K., Kark R.M.: Transient and permanent deafness following treatment with ethacrynic acid in renal failure, Lancet 1, 77-79 (1969)

Prazma J., Thomas W.G., Fischer N.D., Preslar M.J.: Ototoxicity of the ethacrynic acid. Arch.Otolaryng 95, 448-456 (1972)

Riordan J.R., Manery J.F., Dryden E.E., Still J.S.: Influence of ethacrynic acid on muscle surface enzymes and of ethacrynic acid and ouabain on Na, K, and H_2O in frog muscle. Can.J.Physiol.Pharmacol. 50, 432-444 (1972)

Schmidt R.S., Fernandez C.: Labyrinthine DC potentials in representative vertebrates. J. Cell.Comp.Physiol. 59, 311-321 (1962)

Schmidt R.S.: Types of endolymphatic potentials. Comp.Biochem.Physiol. 10, 83-87 (1963)

Schneider W.J., Becker E.L.: Acute transient hearing loss after ethacrynic acid therapy. Arch.Int.Med. 117, 715-717 (1966)

Schulze B.: Natrium und Kalium in Endo- und Perilymphe des Frosches. Med.Diss., Düsseldorf (1969)

Sejersted O.M., Holdaas H., Monclair T.: Functional differences of ouabain and ethacrynic acid on renal potassium metabolism in dogs. Scand.J.clin.Lab.Invest. 38, 603-614 (1978)

Sellick P.M., Johnstone B.M.: Changes in cochlear endolymph Na^+ concentration measured with Na^+ specific microelectrodes. Pflügers Arch. 336, 11-20 (1972)

Sellick P.M., Bock G.R.: Evidence for an electrogenic potassium pump as the origin of the positive component of the endocochlear potential. Pflügers Arch. 352, 351-361 (1974)

Sellick P.M., Johnstone B.M.: Production and role of inner ear fluid. Prog. Neurobiol. 5, 337-362 (1975)

Shakhmatova E.I., Natochin Y.V.: Effect of furosemide and ethycrynic acid on sodium transport and potassium secretion. Biull. Eksp.Biol.Med., 84, 319-321 (1977)

Silverstein H., Yules R.B.: The effect of diuretics on cochlear potentials and inner ear fluids. Laryngoscope 81, 873-888 (1971)

Simon E.J., Hilding D.A., Kashgarian M.: Micropuncture study of the mechanism of endolymph production in the frog. Am.J.Physiol. 225, 114-118 (1973)

Taglietti V., Rossi M.L., Casella C.: Electrogenic sodium pump in frog crista ampullaris. Exp. Brain. Research Suppl. 25, 195 (1975)

Thalmann R., Miyoshi T., Kusakari J., Ise I.: Normal and abnormal energy metabolism of the inner ear. Otolaryngol.Clin.No. Am 8, 313-333 (1975)

Valli P., Zucca G., Casella C.: The importance of potassium in the function of frog semicircular canals. Acta Otolaryngol 84, 344-351 (1977)

Vosteen K.-H.: Die Produktion von Endo- und Perilymphe und die Durchlässigkeit der Innenohrmembranen. Arch. Oto-Rhino-Laryng. 212, 219-229 (1976)

Wever E.G.: The ear and hearing in the frog, rana pipiens J. Morph. 141, 461-478 (1973)

Herrn Prof. Dr. C. Morgenstern danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

Lebenslauf

Ich wurde am 16. Februar 1955 als Sohn der Eheleute Karl-Heinz und Gisela Schaube in Düsseldorf geboren.

Nach 4 Volksschuljahren in Düsseldorf besuchte ich dort das humanistische Comenius-Gymnasium und bestand am 1o. Juni 1974 die Reifeprüfung.

Im Wintersemester 1974/75 begann ich mit dem Studium der Philosophie an der Universität Düsseldorf. Ab Sommersemester 1975 studierte ich an der gleichen Universität Medizin.

Ich bestand am 25. März 1977 die ärztliche Vorprüfung, am 31. März 1978 den 1. Abschnitt und am 14. März 198o den 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Zur Zeit absolviere ich das "Praktische Jahr" in den Städt. Krankenanstalten Krefeld und beabsichtige den 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung im Frühjahr 1981 abzulegen.